

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/82, 15/54, A01H 5/00</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/27674</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>12. September 1996 (12.09.96)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP96/01007</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, PL, SI, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>8. März 1996 (08.03.96)</b>		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(30) Prioritätsdaten: <b>195 09 695.9 8. März 1995 (08.03.95) DE</b>			
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH [DE/DE]; Ihnestrasse 63, D-14195 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): KOSSMANN, Jens [DE/DE]; Golmer Fichten 9, D-14476 Golm (DE). SPRINGER, Franziska [DE/DE]; Mühlenstrasse 1, D-14167 Berlin (DE). BÜTTCHER, Volker [DE/DE]; Hundebreite 39, D-37697 Lauenförde (DE).			
(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).			

(54) Titel: MODIFIED STARCH FROM PLANTS, PLANTS SYNTHESIZING THIS STARCH, AND PROCESS FOR ITS PREPARATION

(54) Bezeichnung: MODIFIZIERTE STÄRKE AUS PFLANZEN, PFLANZEN, DIE DIESE SYNTHETISIEREN, SOWIE VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG

(57) Abstract

The invention concerns transgenic plant cells and plants which synthesize a modified starch owing to reduced activity of a disproportionating enzyme (D-enzyme). The invention further concerns the starch synthesized in these plant cells and plants.

(57) Zusammenfassung

Es werden transgene Pflanzenzellen und Pflanzen beschrieben, die aufgrund einer verringerten Aktivität eines Disproportionierenden Enzyms (D-Enzyms) eine modifizierte Stärke synthetisieren. Ferner wird die in diesen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke beschrieben.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

**Modifizierte Stärke aus Pflanzen, Pflanzen, die diese synthetisieren, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung**

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzen, die aufgrund gentechnischer Veränderungen eine modifizierte Stärke synthetisieren, insbesondere eine Stärke, die im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke veränderte Verkleisterungseigenschaften und einen erhöhten Phosphatgehalt besitzt. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung der transgenen Pflanzen sowie die aus diesen Pflanzen isolierbare modifizierte Stärke. Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von DNA-Sequenzen, die Disproportionierende Enzyme (EC 2.4.1.25) codieren, für die Herstellung von transgenen Pflanzen, die eine verringerte Aktivität dieser Enzyme aufweisen und die eine modifizierte Stärke synthetisieren.

Das Polysaccharid Stärke, das einen der wichtigsten Speicherstoffe im Pflanzenreich darstellt, findet neben der Verwendung im Nahrungsmittelbereich auch eine breite Verwendung als nachwachsender Rohstoff für die Herstellung industrieller Produkte. Um die Anwendung dieses Rohstoffes in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es notwendig, eine große Stoffvielfalt und eine Anpassung an die jeweiligen Anforderungen der zu verarbeitenden Industrie zu erreichen.

Obwohl Stärke aus einem chemisch einheitlichen Grundbaustein, der Glucose, aufgebaut ist, stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Es handelt sich dabei eher um ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Verzweigungsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten unterscheiden. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-verknüpften Glu-

cosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ein Gemisch aus unterschiedlich stark verzweigten Glucoseketten darstellt, wobei die Verzweigungen durch das Auftreten von  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande kommen.

Die molekulare Struktur der Stärke, die zu einem großen Teil durch den Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, die durchschnittliche Kettenlänge sowie das Vorhandensein von Phosphatgruppen bestimmt wird, ist ausschlaggebend für wichtige funktionelle Eigenschaften der Stärke bzw. ihrer wässrigen Lösungen. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen die Löslichkeit, das Retrogradierungsverhalten, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Farbstabilität, die Verkleisterungseigenschaften, d.h. Binde- und Klebeigenschaften, sowie die Kältestabilität. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein.

Die Anpassung der aus Pflanzen isolierbaren Stärke an bestimmte industrielle Verwendungszwecke erfolgt häufig mit Hilfe chemischer Modifikationen, die in der Regel zeit- und kostenintensiv sind. Es erscheint daher wünschenswert, Möglichkeiten zu finden, modifizierte Stärke, die in ihren Eigenschaften bereits den Anforderungen der verarbeitenden Industrie entspricht, direkt in Pflanzen zu synthetisieren und die modifizierte Stärke aus diesen Pflanzen zu isolieren.

Herkömmliche Wege zur Herstellung von Pflanzen, die eine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen modifizierte Stärke synthetisieren, bestehen in klassischen Züchtungsverfahren und der Erzeugung von Mutanten. So wurde beispielsweise bei Mais eine Mutante erzeugt, die eine Stärke mit veränderten Viskositätseigenschaften synthetisiert (US Patentschrift 5,331,108), sowie eine Maissorte (waxy maize) durch Züchtung etabliert, deren Stärke zu nahezu 100 % aus Amylopektin besteht (Akasuka und Nelson, J. Biol. Chem. 241 (1966), 2280-2285).

Alternativ können Pflanzen, die eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren, mit Hilfe gentechnischer Ver-

fahren erzeugt werden. Beschrieben wurde beispielsweise in mehreren Fällen die gentechnische Veränderung von Kartoffelpflanzen, mit dem Ziel der Veränderung der in den Pflanzen synthetisierten Stärke (z.B. WO 92/11376; WO 92/14827). Obwohl bereits in einigen Fällen die Herstellung einer veränderten Stärke in Pflanzen gelang, besteht nach wie vor Bedarf an Verfahren zur Herstellung einer im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke modifizierten Stärke, die sich in speziellen industriellen Verarbeitungsprozessen bevorzugt einsetzen lässt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, die sich hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften von natürlicherweise in den Pflanzen synthetisierter Stärke unterscheidet und somit für spezielle Verwendungszwecke besser geeignet ist, sowie Verfahren zur Herstellung derartiger Pflanzen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung transgene Pflanzenzellen, bei denen die Aktivität eines "Disproportionierenden Enzyms" (auch 4- $\alpha$ -Glucanotransferase; EC 2.4.1.25; im folgenden D-Enzym genannt) verringert ist im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen, entweder aufgrund der Einführung und Expression einer exogenen DNA-Sequenz oder der Einführung einer Mutation in einem Gen, das ein Disproportionierendes Enzym codiert.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß transgene Pflanzen, die derartige Zellen enthalten und die im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine verringerte Aktivität des D-Enzyms aufweisen, eine modifizierte Stärke synthetisieren, die sich hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften stark von natürlicherweise in Pflanzen synthetisierter

Stärke unterscheidet. Wässrige Lösungen der in diesen Pflanzen synthetisierten Stärke weisen beispielsweise im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke ein deutlich verändertes Viskositätsverhalten auf. Eine verringerte Aktivität des D-Enzyms im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen bedeutet dabei, daß diese Pflanzen nur 50 %, vorzugsweise weniger als 25 % und besonders bevorzugt weniger als 10 % der D-Enzymaktivität von Wildtyp-Pflanzen aufweisen. D-Enzyme sind dabei definiert als Enzyme, die den Transfer von Glucanen von einem 1,4- $\alpha$ -D-Glucan auf ein anderes 1,4- $\alpha$ -D-Glucan oder auf Glucose katalysieren. Effektive Glucan-Donatoren sind dabei Maltooligosaccharide, lösliche Stärke, sowie Amylopektin (Takaha et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 1391-1396). In der Regel wird eine Maltose-Gruppe übertragen, außer wenn Maltotetraose als Donor dient. In diesem Fall wird Maltotriose übertragen.

"Exogene DNA-Sequenz" bedeutet, daß die eingeführte DNA-Sequenz entweder heterolog in bezug auf die transformierte Pflanzenzelle ist, d.h. aus einer Zelle mit einem anderen genetischen Hintergrund stammt, oder homolog in bezug auf die transformierte Zelle ist, aber in diesem Fall nicht in seiner natürlichen Umgebung im Genom der transformierten Zelle lokalisiert ist. Das heißt, daß die exogene DNA-Sequenz an einem Ort im Genom lokalisiert ist, an dem sie natürlicherweise nicht vorkommt, und daß sie von Genen flankiert ist, die natürlicherweise nicht benachbart zu ihr liegen.

"Expression" bedeutet, daß die exogene DNA-Sequenz in den Zellen zumindestens transkribiert wird. Codiert sie ein Protein, so umfaßt dieser Begriff auch die Translation.

Die Verringerung der D-Enzymaktivität in den erfindungsgemäßen Zellen kann prinzipiell auf verschiedene Art und Weise bewirkt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Verringerung der D-Enzymaktivität in den transgenen Zellen durch die In-

hibierung der Synthese eines funktionellen D-Enzyms in den Zellen erreicht.

"Inhibierung der Synthese" bedeutet dabei, daß die Synthese eines endogenen D-Enzyms im Vergleich zu nichttransformierten Zellen verringert ist, vorzugsweise um mindestens 50 %, insbesondere um mindestens 75 % und besonders bevorzugt um mindestens 90 %. Nachweisbar ist die Verringerung der Synthese beispielsweise durch Nachweis des Enzyms im Western-Blot mit Hilfe D-Enzym-spezifischer Antikörper. Die D-Enzymaktivität kann auch bestimmt werden wie in Takaha et al (J. Biol. Chem. 268 (1993), 1391-1396) beschrieben. Möglich ist ferner der Nachweis der D-Enzym-Transkripte im Northern-Blot.

"Funktionell" bedeutet, daß das Enzym seine natürliche oben beschriebene Enzymaktivität aufweist und diese etwa so hoch ist wie in Wildtyp-Zellen.

Eine Verringerung der Synthese eines D-Enzyms in den erfundungsgemäßen Zellen kann auf verschiedene Art und Weise erreicht werden. Eine erste Möglichkeit ist die Veränderung der endogenen, in dem Genom der Zelle vorliegenden Sequenzen, die D-Enzyme codieren, oder von deren regulatorischen Regionen.

Diese können beispielsweise durch Transposonmutagenese, andere herkömmliche Mutageneseverfahren oder "gene tagging" inaktiviert werden, so daß die Synthese endogener D-Enzyme weitgehend oder vollkommen inhibiert ist.

Möglichkeiten, die genomischen Sequenzen zu verändern umfassen beispielsweise Gendisruption, Insertion, Deletion, Rekombination, Addition etc.

Neben einer vollständigen Inaktivierung der genomischen DNA-Sequenzen, die D-Enzyme codieren, ist es auch denkbar, diese derart zu modifizieren, daß kein funktionelles D-Enzym in den Zellen mehr synthetisiert wird.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Transkription oder Translation der endogen in der Zelle vorliegenden Gene

für D-Enzyme zu stören. Techniken, wie dies erreicht werden kann, sind dem Fachmann bekannt.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verringerung der Synthese funktionellen D-Enzyms in den erfindungsgemäßen Zellen mittels eines antisense-Effektes.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verringerung der Synthese funktionellen D-Enzyms in den erfindungsgemäßen Zellen mittels der Expression eines Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die D-Enzym codieren. Besonders bevorzugt sind hierbei Ribozyme, die mit Sequenzen kombiniert sind, die einen antisense-Effekt bewirken, d.h. die komplementär zu D-Enzym-Transkripten sind.

Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung der Synthese funktionellen D-Enzyms besteht in der Ausnutzung eines Co-suppressions-Effektes.

Eine weitere Möglichkeit der Verringerung der D-Enzymaktivität in Pflanzenzellen besteht in der Inaktivierung bereits synthetisierter D-Enzyme.

Somit codiert in einer bevorzugten Ausführungsform die exogene DNA-Sequenz ein Polypeptid, das zu einer Verringerung der D-Enzymaktivität führt. Denkbar ist hierbei beispielsweise die Expression von D-Enzym-spezifischen Antikörpern.

Soll die exogene DNA-Sequenz in den transgenen Zellen exprimiert werden, so wird sie mit regulatorischen Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen beispielsweise Promotoren. Für die Expression kommt im Prinzip jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Es können sowohl virale als auch pflanzliche Promotoren verwendet werden. Der Promotor kann homolog oder heterolog sowohl in bezug auf die verwendete Pflanzenspezies sein als auch in bezug auf die exogene DNA-Sequenz. Geeignet sind sowohl Promotoren, die eine konstitutive

tive Expression gewährleisten, wie beispielsweise der 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Odell et al., *Nature* 313 (1985) 810-812) und das in der WO 94/01571 beschriebene Promotorkonstrukt, als auch Promotoren, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt (siehe beispielsweise WO 93/07279) oder in einem bestimmten Gewebe der Pflanze zu einer Expression nachgeschalteter Sequenzen führen (siehe z. B. Stockhaus et al., *EMBO J.* 8 (1989) 2245-2251). Präferentiell werden Promotoren eingesetzt, die in typischen "sink"-Organen von Pflanzen aktiv sind. "Sink"-Gewebe sind definiert als Nettoimporteure des in photosynthetisch aktiven Geweben fixierten Kohlenstoffs. Typische sink-Organen sind z.B. Wurzeln, Blüten und Speicherorgane. In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden ferner bevorzugt Promotoren verwendet, die in den stärkespeichernden Organen der zu transformierenden Pflanzen aktiv sind. Als stärkespeichernde Organe kommen z.B. die Samen von verschiedenen Getreidearten, Mais, Reis, und Erbse in Frage, sowie die Knollen von Kartoffeln. Bekannt ist zum Beispiel der USP-Promotor aus *Vicia faba*, der eine samenspezifische Expression in *Vicia faba* sowie in anderen Pflanzenarten gewährleistet (Fiedler et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., *Mol. Gen. Genet.* 225 (1991), 459-467), sowie der Promotor des Acyl Carrier Protein-Gens (Baerson et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 255-267). Promotoren, von denen bekannt ist, daß sie im Endosperm von Maiskörnern aktiv sind, sind beispielsweise die Promotoren der Zein-Gene (Pedersen et al., *Cell* 29 (1982), 1015-1026; Quattrocchio et al., *Plant Mol. Biol.* 15 (1990), 81-93). Zur Transformation der Kartoffel können insbesondere, aber nicht ausschließlich, Promotoren der Patatingene der Klasse I aus Kartoffel verwendet werden, die eine knollenspezifische Expression gewährleisten, wie beispielsweise der B33-Promotor (Rocha-Sosa et al., *EMBO J.* 8 (1989), 23-29).

Neben dem Promotor können die regulatorischen Elemente auch DNA-Sequenzen enthalten, die eine weitere Steigerung der Transkription gewährleisten, beispielsweise sogenannte

Enhancer-Elemente. Derartige Regionen können von viralen Genen oder geeigneten eukaryontischen Genen gewonnen werden oder synthetisch hergestellt werden. Sie können homolog oder heterolog in bezug auf den verwendeten Promotor sein.

Codiert die exogene DNA-Sequenz ein Polypeptid, so kann sie ferner verknüpft sein mit Sequenzen, die im transkribierten Bereich liegen und eine effizientere Translation der synthetisierten RNA in das entsprechende Protein gewährleisten, z.B. mit sogenannten Translationsenhancern.

Die regulatorischen Elemente können ferner Sequenzen umfassen, die der korrekten Beendigung der Transkription sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dienen, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben und sind beliebig austauschbar. Beispiele für derartige Terminationssequenzen sind die 3'-nichttranslatierten Regionen, die das Polyadenylierungssignal des Nopalin-Synthase-Gens (NOS-Gen) oder des Octopinsynthase-Gens (Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) aus Agrobakterien umfassen, oder die 3'-nichttranslatierten Regionen der Gene der Speicherproteine aus Sojabohne, sowie die der Gene der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase (ssRUBISCO).

Wird für die Verringerung der Synthese funktionellen D-Enzyms eine antisense-RNA exprimiert, so kommt für die exogene DNA-Sequenz, die diese codiert prinzipiell jede beliebige DNA-Sequenz in Frage, die ein D-Enzym codiert und die eine ausreichend hohe Homologie aufweist, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Bevorzugt werden DNA-Sequenzen aus Pflanzen verwendet. Es handelt sich dabei vorzugsweise um eine DNA-Sequenz homologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies. Es können jedoch auch DNA-Sequenzen aus anderen Spezies verwendet werden, solange gewährleistet ist, daß die Homologie zu den endogenen DNA-Sequenzen der zu transformierenden Spezies hoch

genug ist, um einen antisense-Effekt zu gewährleisten. Dabei sollte die Homologie höher als 80 %, vorzugsweise höher als 90 % und insbesondere höher als 95 % sein.

Es können Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp verwendet werden. Eine inhibierende Wirkung ist aber auch bei der Verwendung kürzerer Sequenzen nicht ausgeschlossen. Bevorzugt werden längere Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren verwendet, für eine effiziente antisense-Inhibition werden insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 Basenpaaren verwendet. In der Regel werden Sequenzen verwendet, die kürzer als 5000 Basenpaare sind, bevorzugt Sequenzen, die kürzer als 2500 Basenpaare sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsmäßigen Zellen transgene Kartoffelzellen, die mit einer DNA-Sequenz aus Kartoffel transformiert sind, die das D-Enzym codiert, oder mit Teilen einer derartigen Sequenz, insbesondere der DNA-Sequenz, die von Takaha et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 1391-1396) beschrieben wird (zugänglich in der GenEMBL-Datenbank unter der Zugriffsnummer X68664).

Es ist jedoch auch möglich andere DNA-Sequenzen zu verwenden, die D-Enzyme codieren und die sich aus anderen Organismen, insbesondere aus anderen Pflanzenspezies, isolieren lassen, z.B. mit Hilfe der bereits bekannten Sequenzen über Hybridisierung oder andere Standardtechniken.

Zur Inhibierung der Synthese von D-Enzym in Zellen transgener Pflanzen mit Hilfe eines geeigneten Ribozyms, gibt es wiederum verschiedene Möglichkeiten.

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle, die in der Lage sind, RNA-Moleküle an spezifischen Zielsequenzen zu spalten. Mit Hilfe gentechnologischer Methoden ist es möglich, die Spezifität von Ribozymen zu verändern. Es existieren verschiedene Klassen von Ribozymen. Für die praktische Anwendung mit dem Ziel, das Transkript eines bestimmten Gens gezielt zu spalten, werden bevorzugt Vertreter zweier verschiedener Gruppen von Ribozymen verwendet. Die eine Gruppe

wird gebildet von Ribozymen die dem Typ der Gruppe I-Intron-Ribozymen zuzuordnen sind. Die zweite Gruppe wird von Ribozymen gebildet, die als charakteristisches Strukturmerkmal ein sogenanntes "hammerhead"-Motiv aufweisen. Die spezifische Erkennung des Ziel-RNA-Moleküls kann modifiziert werden durch Änderung der Sequenzen, die dieses Motiv flankieren. Diese Sequenzen bestimmen über Basenpaarung mit Sequenzen im Zielmolekül die Stelle, an der die katalytische Reaktion und somit die Spaltung des Zielmoleküls erfolgt. Da die Sequenzanforderungen für eine effiziente Spaltung äußerst gering sind, erscheint es daher im Prinzip möglich, spezifische Ribozyme für praktisch jedes beliebige RNA-Molekül zu entwickeln.

Die Herstellung genetisch veränderter Pflanzenzellen, deren Aktivität des D-Enzyms reduziert ist, kann daher auch erfolgen durch Einführung und Expression eines rekombinanten doppelsträngigen DNA-Moleküls in Pflanzen, das sich zusammensetzt aus:

- (a) einem in Pflanzen funktionalen Promotor
- (b) einer DNA-Sequenz, die eine katalytische Domäne eines Ribozyms codiert und die flankiert ist von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu Sequenzen des Zielmoleküls, und
- (c), falls erforderlich, einem in Pflanzen funktionalen Signal für die Transkriptionstermination und Polyadenylierung eines RNA-Moleküls.

Für die unter Punkt (b) genannte Sequenz kommt z.B. die katalytische Domäne der Satelliten-DNA des SCMo-Virus (Davies et al., *Virology*, 177 (1990), 216-224) oder die der Satelliten-DNA des TobR-Virus (Steinecke et al., *EMBO J.* 11 (1992), 1525-1530; Haseloff and Gerlach, *Nature* 334 (1988), 585-591) in Betracht.

Die DNA-Sequenzen, die die katalytische Domäne flankieren, werden gebildet von DNA-Sequenzen, die homolog sind zu den Sequenzen endogener D-Enzym-Gene.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen können prinzipiell von jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, insbesondere von Pflanzen, die ein Protein mit D-Enzymaktivität exprimieren. Von Interesse sind sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt wird das Verfahren auf Nutzpflanzen angewendet, insbesondere auf Pflanzen, die Stärke als Speichersubstanz synthetisieren und Stärke-speichernde Organe bilden, wie zum Beispiel Getreidearten, Reis, Kartoffeln, Leguminosen oder Maniok.

Unter Getreidepflanzen werden insbesondere monokotyle Pflanzen verstanden, die zur Ordnung Poales, bevorzugt solche, die zur Familie der Poaceae gehören. Beispiele hierfür sind die Pflanzen, die zu den Gattungen *Avena* (Hafer), *Triticum* (Weizen), *Secale* (Roggen), *Hordeum* (Gerste), *Oryza* (Reis), *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria*, *Sorghum* (Hirse), *Zea* (Mais) etc. gehören. Stärkespeichernde Leguminosen sind z.B. manche Arten der Gattung *Pisum* (z.B. *Pisum sativum*), *Vicia* (z.B. *Vicia faba*), *Cicer* (z.B. *Cicer arietinum*), *Lens* (z.B. *Lens culinaris*), *Phaseolus* (z.B. *Phaseolus vulgaris* und *Phaseolus coccineus*), etc.

Für Herstellung von Expressionkassetten, die in den pflanzlichen Zellen zur Synthese eines Polypeptids, einer antisense-RNA oder eines Ribozyms etc. führen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Gängige Clonierungsmethoden sind in der Literatur vielfach beschrieben (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), (Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press)).

Für die Einführung der Expressionskassette in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transforma-

tionsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Die Einführung der beschriebenen Expressionskassette in pflanzliche Zellen erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere von Plasmiden, die für die Transformation von Pflanzenzellen geeignet sind und die Integration der Expressionskassette in das pflanzliche Genom gewährleisten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Die Infektion einer Pflanzenzelle führt dann zum Einbau der T-DNA einschließlich der neuen Gene in die Chromosomen der Pflanzenzellen.

Für die Transformation mit Hilfe der Agrobakterien muß die einzuführende DNA zunächst in spezielle Plasmide cloniert werden, z.B. in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Der intermediäre Vektor kann mittels eines Helferplasmids durch Konjugation auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen und dann aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Diese Plasmide enthalten zusätzlich die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region.

Im Gegensatz zu intermediären Vektoren, die nicht in Agrobakterien replizieren, können sich binäre Vektoren sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien vermehren. Sie besitzen ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden, und können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al., Mol. Genet. 163 (1978), 181-187). Bekannte binäre Vektoren sind beispielsweise der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant. Sci. 66 (1990), 221-230) oder der Vektor pBin19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8721), der kommerziell erhältlich ist (Clontech Laboratories, Inc., USA).

Die Übertragung der T-DNA einschließlich der neuen Gene in Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4 (1986), 1-46 und An et al., EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels Agrobacterium basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Char et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Deng et al., Science in China 33 (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11 (1992),

76-80; May et al., *Bio/Technology* 13 (1995), 486-492; Conner und Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153 (1992), 550-555; Ritchie et al., *Transgenic Res.* 2 (1993), 252-265).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, *Plant Physiol.* 104 (1994), 37-48; Vasil et al., *Bio/Technology* 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., *Plant Mol. Biol.* 24 (1994), 317-325; Spencer et al., *Theor. Appl. Genet.* 79 (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875; Fromm et al., *Biotechnology* 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2 (1990), 603-618; Koziel et al., *Biotechnology* 11 (1993), 194-200). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (*Bio/Technology* 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen. Prioli und Söndahl (*Bio/Technology* 7 (1989), 589) beschreiben die Regeneration und die Gewinnung fertiler Pflanzen aus Mais-Protoplasten der Cateto Mais-Inzuchtlinie Cat 100-1. Die Autoren vermuten, daß die Protoplasten-Regeneration zu fertilen Pflanzen abhängig ist von einer Anzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. von Genotyp, vom physiologischen Zustand der Donor-Zellen und von den Kultivierungsbedingungen. Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux,

s.o.; Ritala et al., s.o.) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5 (1994), 285-297).

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Gegenstand der Erfindung sind auch Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen erfindungsgemäßen Pflanzenzellen enthalten. Solche Pflanzen können beispielsweise mittels mikrobiologischer Verfahren, wie in den Beispielen beschrieben, aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen regeneriert werden. Der Begriff "Pflanze" umfaßt hierbei auch Teile der Pflanze, wie z.B. einzelne Organe (Blätter, Wurzel, Stamm) etc., erntebare Teile, Gewebe etc. Erntebare Teile sind z.B. Samen, Knollen, photosynthetisches Gewebe, Rüben usw.

Die Erfindung betrifft ferner Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, das oben beschriebene transgene

Pflanzenzellen enthält. Dazu zählen beispielsweise Früchte, Samen, Stecklinge, Wurzelstöcke, Knollen, etc.

Aufgrund der Verringerung der Aktivität des D-Enzyms wird in den erfindungsgemäßen Zellen und Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisiert, die sich hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften, insbesondere ihrer Verkleisterungseigenschaften sowie ihres Phosphatgehaltes, von in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke unterscheidet.

Gegenstand der Erfindung ist daher auch eine Stärke, die erhältlich ist aus den erfindungsgemäßen Zellen, Pflanzen oder Vermehrungsmaterial dieser Pflanzen, die im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine verringerte D-Enzym-Aktivität aufweisen.

Die Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen erhältlich ist, bei denen die Synthese des D-Enzyms inhibiert ist, zeigt Charakteristika, die stark von denen abweichen, die Stärke zeigt, die aus Wildtyp-Pflanzen isolierbar ist, z.B. veränderte Verkleisterungseigenschaften. Dies zeigt sich in einer veränderten Viskosität wässriger Lösungen dieser Stärke im Vergleich zu wässrigen Lösungen von Wildtyp-Stärke (siehe Fig. 3, 4, 5 und 6).

Ein gängiger Test, der verwendet wird, um die Viskositäteigenschaften zu bestimmen, ist der sogenannte Brabender-Test. Dieser Test wird durchgeführt unter der Verwendung eines Apparates, der beispielsweise als Viskograph E bekannt ist. Hergestellt und vertrieben wird dieses Instrument unter anderem von der Firma Brabender OHG Duisburg (Deutschland). Der Test besteht im wesentlichen darin, daß Stärke in Gegenwart von Wasser zunächst erhitzt wird, um zu bestimmen, wann die Hydratisierung und das Schwellen der Stärkekörner einsetzt. Dieser Vorgang, der auch als Gelatinisierung bzw. Verkleisterung bezeichnet wird, beruht auf der Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen und geht einher mit einer meßbaren Viskositätszunahme der Stärkesuspension. Während eine weitere Erhitzung nach der Gelatinisierung zur vollständigen

Auflösung der Stärkepartikel und einer Abnahme der Viskosität führt, kommt es bei einer Abkühlung unmittelbar nach der Gelatinisierung typischerweise zu einer Viskositätszunahme (siehe Fig. 6). Das Resultat eines Brabendertests ist eine Kurve, die die Viskosität in Abhängigkeit von der Zeit angibt, wobei zunächst eine Temperaturzunahme bis über die Gelatinisierungstemperatur und anschließend eine Abkühlung erfolgt.

Die Analyse einer Brabender-Kurve zielt in der Regel ab auf die Bestimmung der Verkleisterungsstemperatur, der maximalen Viskosität bei Erhitzen, der Viskosität nach längerem Kochen, der Viskositätszunahme bei Abkühlung sowie der Viskosität nach dem Erkalten. Diese Parameter sind wichtige Charakteristika, die die Qualität einer Stärke sowie ihre Verwendbarkeit für verschiedene Anwendungen bestimmen.

Ferner zeigt die Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen mit einer verringerten D-Enzymaktivität erhältlich ist, im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt, insbesondere einen Phosphatgehalt, der um mindestens 10 % höher, vorzugsweise um 20 % höher ist, als der Phosphatgehalt von Stärke aus Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff "modifizierte Stärke" wird daher im Rahmen dieser Erfindung eine Stärke verstanden, die sich hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften von Wildtyp-Stärke unterscheidet, insbesondere eine Stärke, die im Vergleich zu Wildtyp-Stärke veränderte Verkleisterungseigenschaften aufweist und deren wässrige Lösungen im Vergleich zu wässrigen Lösungen von Wildtyp-Stärke eine veränderte Viskosität zeigen. Dabei wird die Viskosität vorzugsweise mittels eines Brabender-Viskographen bestimmt. Ferner kann eine derartige modifizierte Stärke im Vergleich zu Wildtyp-Stärke einen erhöhten Phosphatgehalt aufweisen. Dabei ist der Phosphatgehalt dieser Stärke mindestens um 10 %, vorzugsweise um 20 % und besonders bevorzugt um 30 % höher als der Phosphatgehalt von Wildtyp-Stärke.

Eine derartige modifizierte Stärke, die Gegenstand der Erfindung ist, weist vorzugsweise die in Fig. 3, 4 und 5 dargestellten charakteristischen Brabenderkurven auf. Die modifizierte Stärke weist insbesondere unter den in Beispiel 4 genannten Bedingungen zur Bestimmung der Viskosität mit Hilfe eines Brabender-Viskographen mindestens einen der folgende charakteristische Werte auf oder eine Kombination der folgenden Werte:

eine Verkleisterungstemperatur von  $67,3 \pm 0,0^{\circ}\text{C}$ ,

eine maximale Viskosität von  $2823,7 \pm 82,0 \text{ BE}$

eine Viskosität zu Beginn der Haltezeit von  $1517,3 \pm 62,3 \text{ BE}$

eine Viskosität zu Beginn der Kühlzeit von  $641,3 \pm 19,7 \text{ BE}$

eine Viskosität nach dem Erkalten von  $998,0 \pm 18,3 \text{ BE}$ .

Im Rahmen der Meßgenauigkeit, können diese Durchschnittswerte um bis zu 10 % nach oben oder unten von den genannten Werten abweichen, so daß die genannten charakteristischen Werte für die modifizierte Stärke folgende Werte annehmen können:

eine Verkleisterungstemperatur von  $67,3 \pm 6,7^{\circ}\text{C}$ ,

eine maximale Viskosität von  $2824 \pm 283 \text{ BE}$

eine Viskosität zu Beginn der Haltezeit von  $1517 \pm 152 \text{ BE}$

eine Viskosität zu Beginn der Kühlzeit von  $641 \pm 65 \text{ BE}$

eine Viskosität nach dem Erkalten von  $998 \pm 100 \text{ BE}$ .

Die modifizierte Stärke weist in der Regel mindestens einen der oben genannten charakteristischen Werte auf, vorzugsweise eine Kombination mehrerer Werte. Besonders bevorzugt liegen alle Werte in den angegebenen Bereichen.

Durch Anwendung der antisense-Technologie ist es ferner möglich, Pflanzen herzustellen, bei denen die Expression von DNA-Sequenzen, die D-Enzyme codieren, in unterschiedlich starkem Maße inhibiert ist, und die daher eine unterschiedlich starke Reduktion der Aktivität des D-Enzyms aufweisen. Je nach dem Grad der Reduktion der D-Enzym-Aktivität synthetisieren derartige transgene Pflanzen Stärke, die sich hinsichtlich ihrer Verkleisterungseigenschaften und ihres Phosphatgehaltes mehr oder weniger stark von Stärke aus Wildtyp-Pflanzen unterscheidet.

Generell weisen derartige modifizierte Stärken folgenden Eigenschaften im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen auf:

1. eine höhere maximale Viskosität bei Erhitzen
2. eine höhere Viskosität nach Abkühlung.

Die Isolierung der Stärke erfolgt nach herkömmlichen Methoden, wie z.B. beschrieben in "Handbuch der Stärke" (Band I, Max Ullmann (Hrsg.), 1974, Paul Parey Verlag, Berlin, Deutschland) oder in Morrison und Karkalas (Methods in Plant Biochemistry, 2 (1990), 323-352; Academic Press Ltd., London).

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich lässt sich die Einsatzmöglichkeit der Stärke in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfasst die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

### 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wässrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

### 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

#### 2.1 Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositäts-

stabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

## 2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

## 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim

Weben, Stärke als Mittel zur Textilauftrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

#### 2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischt Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

#### 2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

#### 2.6 Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, form-

bare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

#### 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.

#### 2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

#### 2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlamm- aufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

### 2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

### 2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffes und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

### 2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

### 2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Anti-blockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wässrigen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasser- aufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/ Polymermischungen

günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmasenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer transgenen Pflanze kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete

führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Oxidation und
- Veresterungen,

welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden:

- Erzeugung von Stärkeethern  
Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxymethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten

Die Erfindung betrifft somit auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Stärke zur Herstellung von Lebensmitteln oder industriellen Produkten.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von DNA-Sequenzen, die Enzyme mit der enzymatischen Aktivität eines D-Enzyms codieren, für die gentechnische Veränderung von Pflanzen, um Pflanzen zu erzeugen, die eine im Vergleich zu Wildtyp-Stärke veränderte Stärke synthetisieren,

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung hergestellten und verwendeten Plasmide wurden bei der als internationale Hinterlegungsstelle anerkannten Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Bundesrepublik Deutschland,

entsprechend den Anforderungen des Budapester Vertrages für die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke der Patentierung hinterlegt.

Am 26.08.1993 wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Deutschland, folgendes Plasmid hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid p35SH-anti-D (DSM 8479)

Am 10.08.1994 wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM) in Braunschweig, Deutschland, folgendes Plasmid hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid p35S-anti-D (DSM 9365)

Ferner wurde am 20.10.1994 bei der oben genannten Hinterlegungsstelle folgendes Plasmid hinterlegt (Hinterlegungsnummer):

Plasmid pBinAR-Hyg (DSM 9505)

**Fig. 1** zeigt das Plasmid p35SH-anti-D (DSM 8479).

Das Plasmid enthält folgende Fragmente:

A = Fragment A (529 bp) umfaßt den 35S Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV), Nucleotide 6906-7437 des CaMV.

B = Fragment B (2909 bp) umfaßt ein DNA-Fragment, das die codierende Region für das Disproportionierende Enzym aus Kartoffel umfaßt (Takaha et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 1391-1396; Nucleotide 303 bis 1777), und in antisense-Orientierung an den Promotor gekoppelt ist.

C = Fragment C (192 bp) umfaßt das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5, Nucleotide 11749-11939.

Das Plasmid ist ca. 12,7 kb groß und erlaubt Selektion auf Hygromycinresistenz in transformierten Pflanzenzellen.

Fig. 2 zeigt das Plasmid p35S-anti-D (DSM 9365)

Das Plasmid enthält folgende Fragmente:

A = Fragment A (529 bp) umfaßt den 35S Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV), Nucleotide 6906-7437 des CaMV.

B = Fragment B (2909 bp) umfaßt ein DNA-Fragment, das die codierende Region für das Disproportionierende Enzym aus Kartoffel umfaßt (Takaha et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 1391-1396; Nucleotide 303 bis 1777), und in antisense-Orientierung an den Promotor gekoppelt ist.

C = Fragment C (192 bp) umfaßt das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5, Nucleotide 11749-11939.

Das Plasmid ist ca. 12,2 kb groß und erlaubt Selektion auf Kanamycinresistenz in transformierten Pflanzenzellen.

Fig. 3 zeigt eine Brabenderkurve für eine wäßrige Lösung von Stärke aus der transgenen Kartoffellinie JD1-32. Die Kurve wurde wie in Beispiel 3 erläutert aufgenommen.

Dabei bedeuten:

Drehm. Drehmoment

[BE] Brabender-Einheit

Temp. Temperatur

A Verkleisterungsbeginn

B Maximale Viskosität

C Start der Haltezeit

D Start der Kühlzeit

E Ende der Kühlzeit

F Ende der End-Haltezeit

Die blaue Linie gibt die Viskosität (gemessen in Brabender-Einheiten) an. Die rote Linie gibt den Temperaturverlauf an.

Meßbedingungen:

Apparat: Brabender Viskograph E (Brabender OHG Duisburg, Deutschland)

Verwendete Menge Stärke: 30 g

Verwendetes Volumen Lösungsmittel: 450 ml destilliertes Wasser

Rührgeschwindigkeit: 75 Umdrehungen pro min

Erhitzen: von 50°C auf 96°C mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min

Halten der Temperatur: 30 min bei 96°C

Kühlen: von 96°C auf 50°C mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min.

Fig. 4 zeigt eine Brabenderkurve für eine wäßrige Lösung von Stärke aus der transgenen Kartoffellinie JD1-33. Die Kurve wurde wie in Beispiel 3 erläutert aufgenommen.

Die Abkürzungen sind definiert wie für Fig. 3 beschrieben. Die Meßbedingungen entsprechen den unter Fig. 3 beschriebenen.

Fig. 5 zeigt eine Brabenderkurve für eine wäßrige Lösung von Stärke aus der transgenen Kartoffellinie JD1-71. Die Kurve wurde wie in Beispiel 3 erläutert aufgenommen.

Die Abkürzungen sind definiert wie für Fig. 3 beschrieben. Die Meßbedingungen entsprechen den unter Fig. 3 beschriebenen.

Fig. 6 zeigt eine Brabenderkurve für eine wäßrige Lösung von Stärke aus Wildtyp-Pflanzen *Solanum tuberosum* cv. Désirée. Die Kurve wurde wie in Beispiel 3 erläutert aufgenommen.

Die Abkürzungen sind definiert wie für Fig. 3 beschrieben. Die Meßbedingungen entsprechen den unter Fig. 3 beschriebenen.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Verwendete Medien und Lösungen

20 x SSC            175.3 g NaCl  
                      88.2 g Natrium-Citrat  
                      ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O  
                      pH 7,0 mit 10 N NaOH

10 x MEN            200 mM MOPS  
                      50 mM Natriumacetat  
                      10 mM EDTA  
                      pH 7,0

NSEB-Puffer        0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2  
                      7 % SDS  
                      1 mM EDTA  
                      1 % BSA (w/v)

Verwendete Methoden

1. Clonierungsverfahren

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in die binären Vektoren BIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8720) und pBinAR-Hyg (DSM 9505) cloniert.

2. Bakterienstämme

Für die binären Vektoren wurde der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 pGV2260 durchgeführt (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777-4788).

### 3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen&Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim&Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

### 4. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L.cv. *Désirée*) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige&Skoog Physiol. Plant. 15 (1962), 473) mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtkultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 5 mg/l Naphthylessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin bzw. 1 mg/l Hygromycin B, und 0,80 % Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylessigsäure, 20 mg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin bzw. 3 mg/l Hygromycin B, und 0,80 % Bacto Agar gelegt.

### 5. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radiokative Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 6. Northern Blot-Analyse

RNA wurde nach Standardprotokollen aus Blattgewebe von Pflanzen isoliert. 50 µg der RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5 % Agarose, 1 x MEN-Puffer, 16,6% Formaldehyd). Das Gel wurde nach dem Gellauf kurz in Wasser gewaschen. Die RNA wurde mit 20 x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran vom Typ Hybond N (Amersham, UK) transferiert. Die Membran wurde anschließend bei 80°C unter Vakuum für zwei Stunden gebacken.

Die Membran wurde in NSEB-Puffer für 2 h bei 68°C prähybridisiert und anschließend in NSEB-Puffer über Nacht bei 68°C in Gegenwart der radioaktiv markierten Probe hybridisiert.

#### 7. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

Lichtperiode	16 h bei 25000 Lux und 22°C
Dunkelperiode	8 h bei 15°C
Luftfeuchte	60 %

#### 8. Isolierung der Stärke aus Kartoffelpflanzen

Zur Isolierung von Stärke aus Kartoffelknollen wurden die Knollen zunächst in einer Saftpresse zerkleinert. Der resultierende Saft wurde mit geringen Mengen an Natriumsulfit und Natriumbisulfit versetzt und stehengelassen, damit sich die Stärke absetzen konnte. Nach dem Absetzen der Stärke wurde der Überstand abgenommen und die Stärke mindestens 3 mal in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Stärke bei 37°C unter mehrmaligem Wenden getrocknet.

## 9. Bestimmung des Phosphatgehaltes von Stärke

Der Phosphatgehalt der Stärke wurde bestimmt, indem die Menge an Phosphat, das an der C-6-Position von Glucoseresten gebunden war, gemessen wurde. Hierzu wurde Stärke zunächst durch Säurehydrolyse gespalten und anschließend der Gehalt an Glucose-6-Phosphat mittels eines Enzymtests bestimmt, wie im folgenden beschrieben:

100 mg Stärke wurden in 500  $\mu$ l 0,7 N HCl 4 h bei 100°C inkubiert. Nach der Säurehydrolyse wurden 10 ml des Ansatzes in 600  $\mu$ l Imidazolpuffer (100 mM Imidazol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,9; 2 mM NADP<sup>+</sup>) gegeben. Die Bestimmung der Menge an Glucose-6-Phosphat in dem Ansatz erfolgte durch Umsetzung mit dem Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Dazu wurde dem Ansatz 1 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (aus Hefe) zugesetzt und die Menge an gebildetem NADPH durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt.

**Beispiel 1****Konstruktion des binären Plasmids p35SH-anti-D**

Unter Verwendung zweier synthetisch hergestellter Oligonucleotide mit den Sequenzen:

5' - GCCCCCCGGGC TTTTAAGTTC CTTG -3' (Seq ID No. 1)

und

5' - CAGGGTACCT AACATCTTAA TCATC -3' (Seq ID No. 2)

als Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung von cDNA aus Knollengewebe von *Solanum tuberosum* wurde eine Kopie der codierenden Region des Gens, das für das D-Enzym codiert, hergestellt. Das resultierende Fragment umfaßt die Nucleotide 303 bis 1777 der in Takaha et al. (J.

Biol. Chem. 268 (1993), 1391-1396) dargestellten Nucleotidsequenz. Durch die spezifische Sequenz der für die Amplifikation gewählten Oligonucleotide wird am 5'-Ende des codogenen Stranges eine Sma I-Schnittstelle und am 3'-Ende eine Kpn I-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen Sma I und Kpn I geschnitten und in den mit Sma I und Kpn I geschnittenen Vektor pBinAR-Hyg (DSM 9505) ligiert.

Das resultierende Plasmid wurde p35SH-anti-D (DSM 8479) genannt und ist in Fig. 1 dargestellt.

### Beispiel 2

#### Konstruktion des binären Plasmids p35S-anti-D

Für die Herstellung des Plasmids p35S-anti-D wurde zunächst das Plasmid pBIN19-AC hergestellt. Zu diesem Zweck wurde ein 529 bp Fragment, das den 35S-Promotor des CaMV umfaßt (Nucleotide 6909-7437, Franck et al., Cell 21, 285-294), aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al., Nucl. Acids Res. 14, 5857-5868) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen EcoR I und Kpn I isoliert. Dieses Fragment wurde in den mit EcoR I und Kpn I geschnittenen Vektor pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8721) ligiert. Dabei entstand das Plasmid pBIN19-A.

Anschließend wurde ein 192 bp-Fragment, das das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3, 835-846; Nucleotide 11749-11939) umfaßt, als Pvu II/Hind III-Fragment aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al., Nature 303, 209-213) isoliert. Nach Addition eines Sph I-Linkers an die Pvu II-Schnittstelle wurde das Fragment in den mit Sph I und Hind III geschnittenen Vektor pBIN19-A ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pBIN19-AC genannt.

Für die Konstruktion des Plasmids p35S-anti-D wurde das wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellte PCR-Fragment in den mit Kpn I und Sma I geschnittenen Vektor pBIN19-AC ligiert.

Das resultierende Plasmid ist in Fig. 2 dargestellt.

### Beispiel 3

Herstellung transgener Kartoffelpflanzen mit einer reduzierten Aktivität des D-Enzyms und Isolierung der in den Pflanzen synthetisierten Stärke

Zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, bei denen die Aktivität des D-Enzyms verringert ist im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, wurden Agrobakterien der Spezies *Agrobacterium tumefaciens* mit dem Plasmid p35S-anti-D transformiert. Das Plasmid wurde mit Hilfe Agrobakterien-vermittelter Transformation in Zellen von Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée transferiert wie oben beschrieben. Aus den transformierten Zellen wurden ganze Pflanzen regeneriert. Die transformierten Pflanzen wurden unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Überprüfung des Erfolges der genetischen Veränderung der Pflanzen erfolgte durch Analyse der Gesamt-RNA in einer Northern-Blot-Analyse bezüglich des Verschwindens der Transkripte, die das D-Enzym codieren. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus Blättern transformierter Pflanzen nach Standardmethoden isoliert, geelektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert, die die D-Enzym aus Kartoffel codierende Region oder einen Teil dieser Region umfaßt. Bei erfolgreich transformierten Pflanzen fehlt in der Northern-Blot-Analyse die Bande, die das spezifische Transkript des D-Enzym-Gens darstellt.

Vier unabhängige Linien transgener Kartoffelpflanzen, die Linien JD1-32, JD1-33, JD1-65 und JD1-71, bei denen in der Northern-Blot-Analyse nur noch sehr geringe bis gar keine Mengen des D-Enzym-spezifischen Transkriptes nachgewiesen werden konnten, wurden näher hinsichtlich der synthetisierten Stärke untersucht.

Dazu wurde aus Knollen der transgenen Pflanzen Stärke nach Standardverfahren isoliert.

**Beispiel 4**

Analyse der Stärke aus Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-D transformiert worden waren

a) Bestimmung der Viskosität

Die aus den transgenen Kartoffelpflanzen isolierte Stärke wurde hinsichtlich der Viskosität wässriger Lösungen dieser Stärke untersucht.

Zur Bestimmung der Viskosität der wässrigen Lösungen der in transformierten Kartoffelpflanzen synthetisierten Stärke wurden jeweils 30 g Stärke in 450 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und für die Analyse in einem Viskograph E (Brabender OHG Duisburg (Deutschland)) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität der wässrigen Lösung der Stärke wurde die Stärkesuspension zunächst von 50°C auf 96°C erhitzt mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min. Anschließend wurde die Temperatur für 30 min bei 96°C gehalten. Danach wurde die Lösung von 96°C auf 50°C abgekühlt mit einer Geschwindigkeit von 3°C pro min. Während der gesamten Dauer wurde die Suspension gerührt (75 Umdrehungen pro Minute) und die Viskosität (in Brabender-Einheiten) bestimmt. Die Ergebnisse derartiger Messungen sind in Form von Kurven, in denen die Viskosität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt ist, in den Figuren 3, 4, 5 und 6 wiedergegeben. Fig. 3 zeigt eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus transgenen Kartoffelpflanzen der Linie JD1-32 isoliert wurde. Fig. 4 zeigt eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus transgenen Kartoffelpflanzen der Linie JD1-33. Fig. 5 zeigt eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus transgenen Kartoffelpflanzen der Linie JD1-71 isoliert wurde. In Fig. 6 ist dagegen eine typische Brabenderkurve für Stärke, die aus nicht-transformierten Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée

isoliert wurde, gezeigt. Aus den Kurven geht zum einen hervor, daß in allen drei transgenen Linien eine Stärke mit fast identischen Viskositätseigenschaften isoliert werden kann. Ferner ist erkennbar, daß die Stärke aus transgenen Kartoffeln Eigenschaften aufweist, die deutlich von denen der Wildtyp-Stärke abweichen. Aus den dargestellten Kurven lassen sich verschiedene charakteristische Werte ableiten.

Für Wildtyp-Pflanzen ergeben sich dabei folgende charakteristische Werte:

Tabelle I

Wert	Name	Zeit [min:sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	Verkleisterungsbeginn	6:30	60,5 ± 17,7	69,9 ± 0,57
B	Maximale Viskosität	11:30	1838,0 ± 161,2	86,0 ± 2,1
C	Start der Haltezeit	15:15	1412,0 ± 18,4	96,0
D	Start der Kühlzeit	45:15	526,0 ± 17,0	96,0
E	Ende der Kühlzeit	60:30	812,0 ± 8,5	50,0
F	Ende der End-Haltezeit	70:45	853,0 ± 5,7	50,0

Anzahl der Messungen n=2

Angegeben sind die Durchschnittswerte der Viskosität bei verschiedenen Temperaturen und zu verschiedenen Zeitpunkten in Brabender-Einheiten zusammen mit den Standardabweichungen, sowie die Verkleisterungstemperatur und die Temperatur, bei der die maximale Viskosität erreicht wird.

Für Pflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-D transformiert worden waren, ergeben sich dabei folgende charakteristische Werte:

Tabelle II  
Transgene Linie JD1-32:

Wert	Name	Zeit [min:sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	Verkleisterungsbeginn	5:45	54,0	67,3
B	Maximale Viskosität	8:45	2905,0	76,3
C	Start der Haltezeit	15:15	1459,0	96,0
D	Start der Kühlzeit	45:15	631,0	96,0
E	Ende der Kühlzeit	60:30	986,0	50,0
F	Ende der End-Haltezeit	70:45	1016,0	50,0

Tabelle III  
Transgene Linie JD1-33:

Wert	Name	Zeit [min:sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	Verkleisterungsbeginn	5:45	16,0	67,3
B	Maximale Viskosität	9:30	2825,0	78,5
C	Start der Haltezeit	15:15	1583,0	96,0
D	Start der Kühlzeit	45:15	664,0	96,0
E	Ende der Kühlzeit	60:30	1019,0	50,0
F	Ende der End-Haltezeit	70:45	1042,0	50,0

Tabelle IV  
Transgene Linie JD1-71:

Wert	Name	Zeit [min:sec]	Drehmoment [BE]	Temperatur [°C]
A	Verkleisterungsbeginn	5:45	60,0	67,3
B	Maximale Viskosität	9:15	2741,0	77,8
C	Start der Haltezeit	15:15	1510,0	96,0
D	Start der Kühlzeit	45:15	629,0	96,0
E	Ende der Kühlzeit	60:30	989,0	50,0
F	Ende der End-Haltezeit	70:45	1011,0	50,0

Für die Stärke aus transgenen Kartoffelpflanzen, bei denen die Aktivität des D-Enzyms stark verringert ist, lassen sich unter den genannten Versuchsbedingungen somit folgende charakteristische Werte ermitteln:

eine Verkleisterungstemperatur von  $67,3 \pm 0^{\circ}\text{C}$ ,

eine maximale Viskosität von  $2823,7 \pm 82,0$  BE

eine Viskosität zu Beginn der Haltezeit von  $1517,3 \pm 62,3$  BE

eine Viskosität zu Beginn der Kühlzeit von  $641,3 \pm 19,7$  BE

eine Viskosität nach dem Erkalten von  $998,0 \pm 18,3$  BE.

Unter Berücksichtigung von Meßungenauigkeiten und Schwankungen zwischen verschiedenen transgenen Linien mit unterschiedlichen D-Enzym-Aktivitäten können die ermittelten Durchschnittswerte um bis zu 10 % nach oben oder unten abweichen, so daß die modifizierte Stärke folgende charakteristischen Werte aufweisen kann:

eine Verkleisterungstemperatur von  $67,3 \pm 6,7^{\circ}\text{C}$ ,

eine maximale Viskosität von  $2824 \pm 283$  BE

eine Viskosität zu Beginn der Haltezeit von  $1517 \pm 152$  BE

eine Viskosität zu Beginn der Kühlzeit von  $641 \pm 65$  BE

eine Viskosität nach dem Erkalten von  $998 \pm 100$  BE.

Da es mit Hilfe der antisense-Technologie möglich ist, Pflanzen herzustellen, bei denen die Expression von DNA-Sequenzen, die D-Enzyme codieren, in unterschiedlich starkem Maße inhibiert ist, können mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens transgene Pflanzen hergestellt werden, die eine mehr oder weniger starke Reduktion der Aktivität des D-Enzyms aufweisen und die daher eine Stärke synthetisieren, die sich hinsichtlich ihrer Verkleisterungseigenschaften mehr oder weniger stark von Wildtyp-Pflanzen unterscheidet.

#### b) Bestimmung des Phosphatgehaltes

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes von Stärke aus transgenen und aus Wildtyp-Pflanzen erfolgte wie oben beschrieben.

Der Gehalt an Glucose-6-Phosphat (angegeben in nmol/mg Stärke) ist in der folgenden Tabelle für nicht-transfor-

mierte Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée sowie als Durchschnittswert für drei Linien (JD1-32; JD1-65; JD1-71) transgener Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid p35S-anti-D transformiert worden waren, angegeben.

Tabelle V

Pflanzen	nMol Glucose-6-Phosphat /mg Stärke	%
Wildtyp	9,55±0,62	100
transgene Linien	12,80±1,80	134

Die Werte zeigen, daß der Phosphatgehalt der modifizierten Stärke aus transgenen Kartoffelpflanzen im Vergleich zu Stärke aus Wildtyp-Pflanzen um ca. 34 % erhöht ist.

42  
SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Institut fuer Genbiologische Forschung Berlin GmbH
- (B) STRASSE: Ihnestr. 63
- (C) ORT: Berlin
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZahl: 14195
- (G) TELEFON: +49 30 83000760
- (H) TELEFAX: +49 30 83000736

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Modifizierte Staerke aus Pflanzen, Pflanzen, die diese synthetisieren, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 19509695.9
- (B) ANMELDETAG: 08-MAR-1995

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCCCCCGGGC TTTTAAGTTC CTTG

24

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Oligonucleotid"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CAGGGTACCT AACATCTTAA TCATC

Aktenzeichen des Anmelders  
oder Anwalts

A 1273 PCT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96 / 01007

## ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEN MIKROORGANISMUS

(Regel 13<sup>th</sup> PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus, der in der Beschreibung genannt ist  
auf Seite 28, Zeile 4-21.

## B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG

Weitere Hinterlegungen sind auf einem  
zusätzlichen Blatt gekennzeichnet 

Name der Hinterlegungsstelle

DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land)

Mascheroder Weg 1b  
38124 Braunschweig  
DE

Datum der Hinterlegung

26.08.1993 / 10.08.1994 / 20.10.1994

Eingangsnummer

DSM 8479 / DSM 9365 / DSM 9505

## C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)

Die Angaben werden auf einem  
gesonderten Blatt fortgesetzt 

Der Anmelder macht Gebrauch von Regel 28(4) EPU.

D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN  
(falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)

EP

## E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen)

Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen,  
z. B. "Eingangsnummer der Hinterlegung") Nur zur Verwendung im AnmeldeamtDieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen  
Anmeldung

Bevollmächtigter Bediensteter:



PETHER R.

 Nur zur Verwendung im Internationalen BüroDieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen  
am:

Bevollmächtigter Bediensteter

Patentansprüche

1. Transgene Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, daß aufgrund der Einführung und Expression einer exogenen DNA-Sequenz oder der Einführung einer Mutation in einem Gen, das ein D-Enzym (EC.2.4.1.25) codiert, die Aktivität des D-Enzyms im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen verringert ist, wodurch es in den Zellen zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt.
2. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die Verringerung der D-Enzymaktivität dadurch erfolgt, daß in den Zellen die Synthese funktionellen D-Enzyms inhibiert wird.
3. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei die Inhibition der Synthese durch Expression einer antisense-RNA erfolgt, die komplementär zu Transkripten ist, die D-Enzyme codieren.
4. Transgene Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die eine Zelle einer stärkespeichernden Pflanze ist.
5. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 4, wobei die stärkespeichernde Pflanze eine Kartoffelpflanze ist.
6. Transgene Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
7. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach Anspruch 6 enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
8. Vermehrungsmaterial nach Anspruch 7, das ein Same oder eine Knolle ist.

9. Stärke erhältlich aus Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, Pflanzen nach Anspruch 6 oder Vermehrungsmaterial nach Anspruch 7 oder 8.
10. Verwendung der Stärke nach Anspruch 9, zur Herstellung von Lebensmitteln oder industriellen Produkten.
11. Verwendung von DNA-Sequenzen, die D-Enzyme codieren, für die gentechnische Veränderung von Pflanzen, um Pflanzen zu erzeugen, die eine im Vergleich zu Wildtyp-Stärke modifizierte Stärke synthetisieren.

1/3

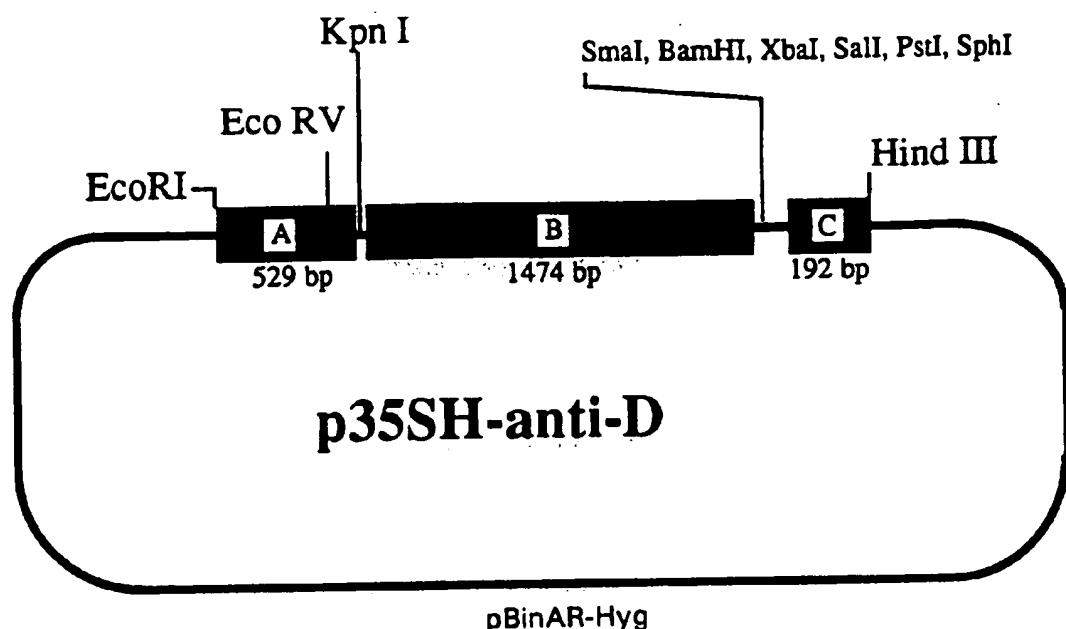


Fig. 1

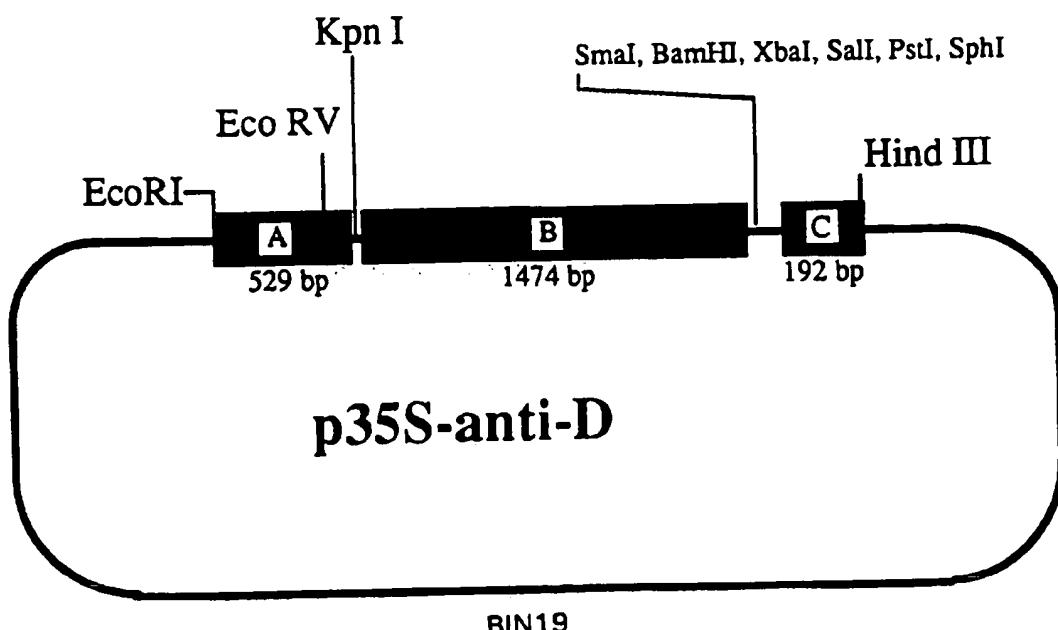
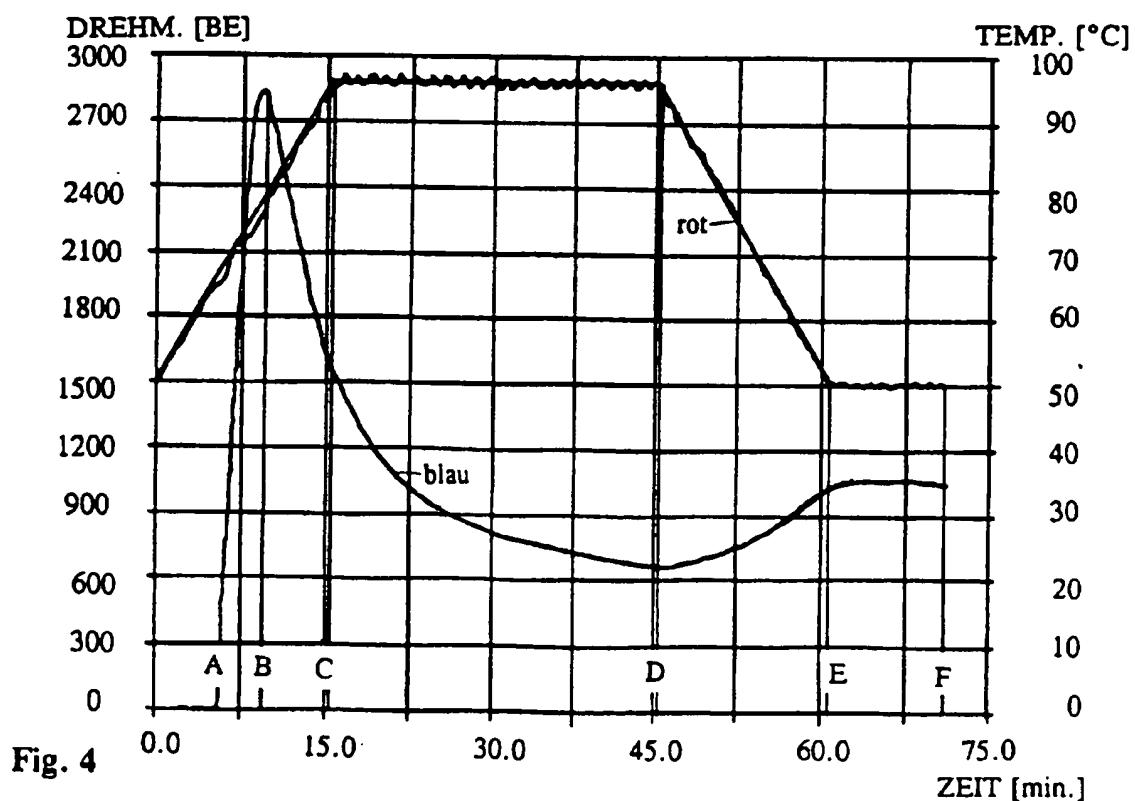
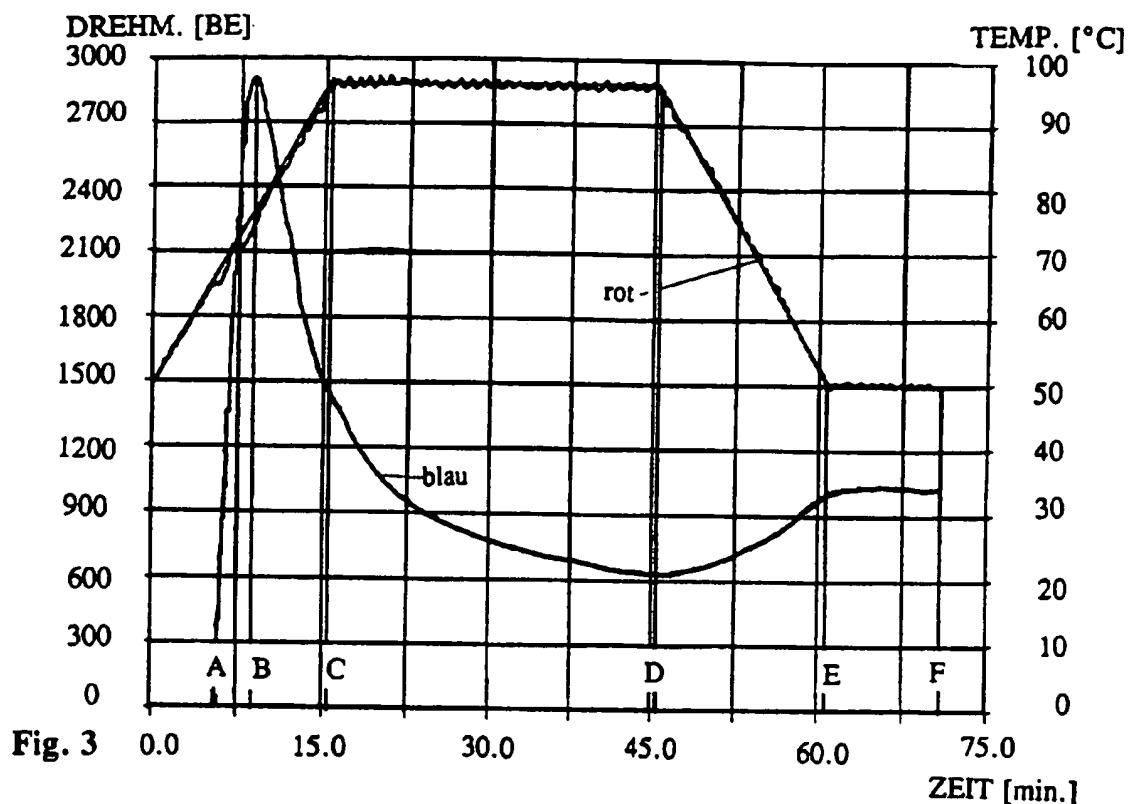
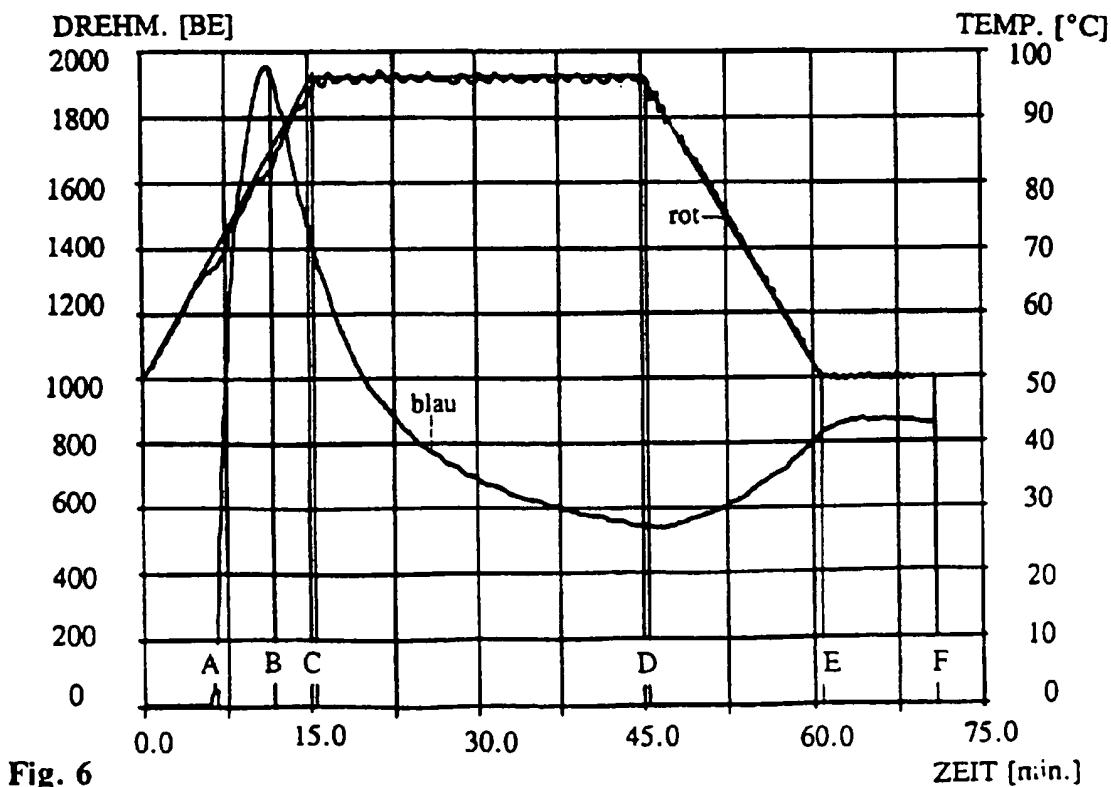
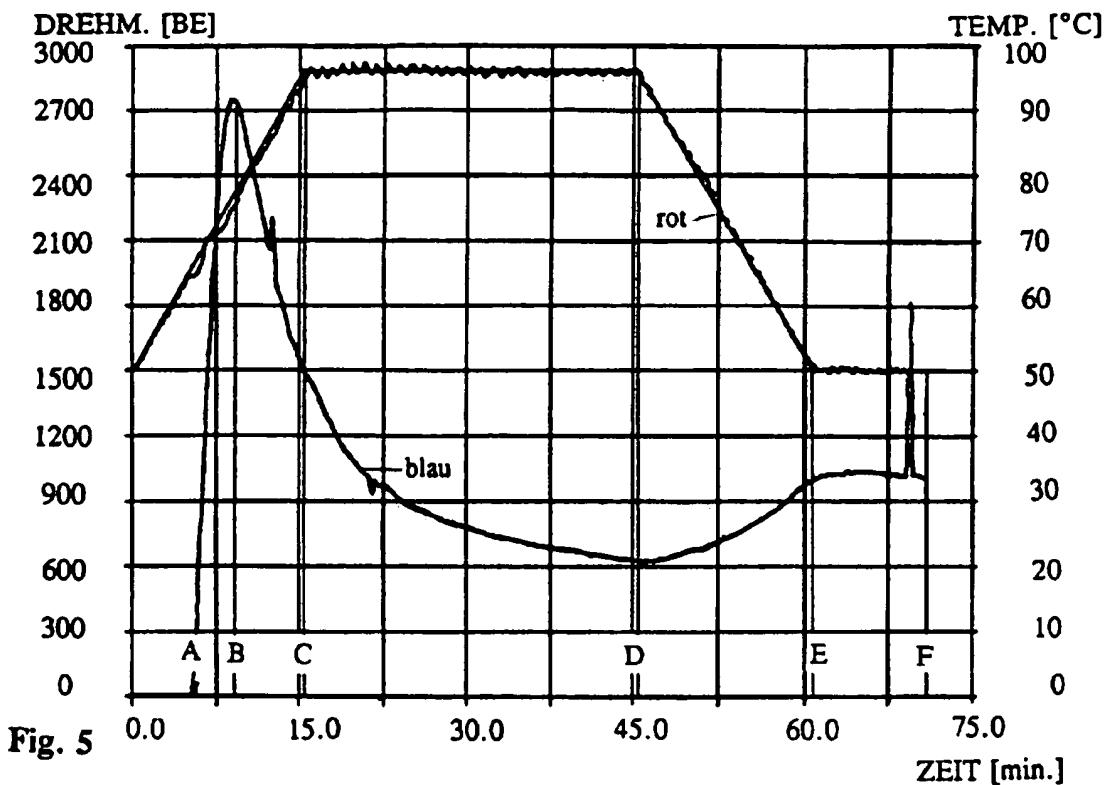


Fig. 2

2/3



3/3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 96/01007

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12N15/82 C12N15/54 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,95 07355 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;KOSSMANN JENS (DE); VIRGIN IVAR (DE) 16 March 1995 see the whole document ---	1-11
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8839 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D17, AN 88-275344 XP002005944 & JP,A,63 202 396 (EZAKI GLICO) , 22 August 1988 see abstract --- -/-	1-11

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*'E' earlier document but published on or after the international filing date
- \*'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*'A' document member of the same patent family

1 Date of the actual completion of the international search

19 June 1996

Date of mailing of the international search report

27.06.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/01007

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J BIOL CHEM 268 (2). 1993. 1391-1396. , XPG02005942 TAKAHASHI ET AL: "DISPROPORTIONATING ENZYME 4-ALPHA GLUCANOTRANSFERASE EC 2.4.1.25 OF POTATO PURIFICATION MOLECULAR CLONING AND POTENTIAL ROLE IN STARCH METABOLISM." see the whole document --- PLANT CELL AND ENVIRONMENT 17 (5). 1994. 601-613. ISSN: 0140-7791, XPG02005943 MUELLER-ROEBER B ET AL: "Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants." see page 608, left-hand column, paragraph 3 -----	1-11
A		1-11

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Int'l. Appl. No.

PCT/EP 96/01007

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9507355	16-03-95	DE-A- 4330960	16-03-95	AU-B- 7657394 27-03-95

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01007

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N15/82 C12N15/54 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 6 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO,A,95 07355 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ; KOSSMANN JENS (DE); VIRGIN IVAR (DE) 16.März 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 8839 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D17, AN 88-275344 XP002005944 & JP,A,63 202 396 (EZAKI GLICO) , 22.August 1988 siehe Zusammenfassung --- -/-	1-11

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

19.Juni 1996

27.06.96

Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Maddox, A

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/01007

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J BIOL CHEM 268 (2). 1993. 1391-1396. , XP002005942 TAKAHASHI ET AL: "DISPROPORTIONATING ENZYME 4-ALPHA GLUCANOTRANSFERASE EC 2.4.1.25 OF POTATO PURIFICATION MOLECULAR CLONING AND POTENTIAL ROLE IN STARCH METABOLISM." siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	PLANT CELL AND ENVIRONMENT 17 (5). 1994. 601-613. ISSN: 0140-7791, XP002005943 MUELLER-ROEBER B ET AL: "Approaches to influence starch quantity and starch quality in transgenic plants." siehe Seite 608, linke Spalte, Absatz 3 -----	1-11

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Inter. nationales Aktenzeichen

**PCT/EP 96/01007**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9507355	16-03-95	DE-A-	4330960	16-03-95